

Title	Role of Aspartic Acid 814 in the Function and Expression of c-Kit Receptor Tyrosine Kinase
Author(s)	森山, 康弘
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40743
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照 ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	もり 森 やま 山 やす 康 ひろ 弘
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 7 2 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平成10年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学 位 論 文 名	Role of Aspartic Acid814 in the Function and Expression of c-Kit Receptor Tyrosine Kinase (c-Kit 受容体型チロシンキナーゼのアスパラギン酸 ⁸¹⁴ 変異による構成的 活性化機構)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 松澤 佑次 (副査) 教 授 北村 幸彦 教 授 金倉 譲

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

c-kit 受容体型チロシンキナーゼ (KIT) はネコの肉腫ウイルス HZ4-FeSV より単離された癌原遺伝子 v-kit の細胞ホモログであり、造血幹細胞やマスト細胞の増殖・分化に必須である。KIT やそのリガンドである stem cell factor (SCF) に機能喪失 (loss-of-function) 変異が存在すると重篤な貧血やマスト細胞の欠損を生じることが知られている。一方、KIT はリガンド依存性に活性化され増殖シグナルを伝達するが、ヒトのマスト細胞性白血病細胞株 (HMC-1)、マウスのマスト細胞腫細胞株 (P-815)、そしてラットのマスト細胞性白血病細胞株 (RBL-2H3) のいずれの細胞においても SCF 非依存性に KIT が活性化 (gain-of-function) しており、その原因はキナーゼドメインの同一コドンのアスパラギン酸をチロシンあるいはバリンへ置換する点突然変異に求めることができる。また、この点突然変異を持つ KIT は強い腫瘍原性を持つにも関わらず細胞表面での発現が野生型 KIT に比べて低下しているという性質を有している。本研究の目的は、この点突然変異の hot spot であるコドン814のアスパラギン酸残基 (Asp⁸¹⁴) の KIT 活性化における役割を解析し、さらに Asp⁸¹⁴変異 KIT の発現低下の機構を明らかにすることである。

【方法ならびに成績】

1. ミスマッチプライマーを用いた PCR 法による点突然変異導入法によりマウス野生型 KIT の Asp⁸¹⁴を他の19種類のアミノ酸に置換した変異型 KIT および Asp⁸¹⁴を欠失させた変異型 KIT をコードする c-kit 遺伝子を作製し、これらを培養ヒト腎細胞株293T に強制発現させた。48時間後に細胞を回収して可溶化し、抗マウス c-kit 抗体で免疫沈降した後、抗リン酸化チロシン抗体によるイムノブロット解析を行い KIT のチロシンリン酸化を解析した。また *in vitro* キナーゼアッセイを行い KIT の活性化についても検討した。Asp⁸¹⁴を他のアミノ酸に置換した変異型 KIT のほとんどで構成的な活性化が認められ、バリン、チロシンのみならずロイシン、イソロイシン、ヒスチジン、フェニアラニン及びトリプトファンに置換した KIT では特に強いチロシン残基のリン酸化とキナーゼ活性が認められた。一方、アスパラギン酸を欠失させた KIT は SCF で刺激してもチロシン残基のリン酸化は認められず、キナーゼ活性も失われていた。

2. 野生型 KIT を強制発現させた293T細胞を³⁵S メチオニンでラベルし、SCF 存在下あるいは非存在下で培養し、SCF 刺激前と刺激後10, 30, 60, 90分後に細胞を回収して可溶化し、KIT を抗マウス c-kit 抗体で免疫沈降して集め、

KIT の degradation の経時的变化を検討した。デンストメーターで定量した結果、SCF で非存在下では KIT の degradation はほとんど認められなかったのに対し、SCF で刺激した場合は急速な KIT の degradation が認められた。一方、変異型 KIT の中でキナーゼ活性が高度に増強しているバリン、チロシン置換体と軽～中等度に増強しているグリシン、ヒスチジン置換体を選んで degradation の経時的变化を検討したところ、いずれの変異型 KIT も SCF 非存在下でも恒常的な degradation が認められた。(バリン、チロシン置換体は半減期各 47, 45分, グリシン、ヒスチジン置換体は半減期各58, 61分)

【総括】

Asp⁸¹⁴ の欠失により KIT は “loss-of-function” となる一方、この残基を他のアミノ酸へ置換することは構成的な活性化を導くことが示された。すなわちこの Asp⁸¹⁴ は KIT の活性化制御に必須のアミノ酸残基であると考えられた。さらに Asp⁸¹⁴ 変異型 KIT はリガンド非依存性に活性化された場合でも速やかに分解されるため、野生型 KIT に比べ細胞表面での発現が低下することが示唆された。

以上の結果より、KIT の Asp⁸¹⁴ は、c-kit 受容体型チロシンキナーゼの活性化制御に必須のアミノ酸残基であり、KIT の Asp⁸¹⁴ の変異は KIT の活性化と発現に関与していることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

c-kit 受容体型チロシンキナーゼ (KIT) は造血幹細胞やマスト細胞の増殖や分化に重要な役割を果たしている。KIT はリガンド依存性に活性化することが知られている。一方、マスト細胞性白血病あるいは腫瘍に由来する 3 種類の細胞株 (HMC-1, RBL-2H3, P-815) では KIT はリガンド非依存性に活性化しており、これらの細胞株の c-kit 遺伝子にはキナーゼ領域の同一コドンのアスパラギン酸に活性化点突然変異が存在していた。また、この点突然変異を持つ KIT は細胞表面での発現が著しく低下していた。本研究はこの突然変異の hot spot であるアスパラギン酸残基 (Asp⁸¹⁴) の KIT 活性化における役割とこの変異による KIT の表面発現の低下機構について検討したものである。PCR 法による点突然変異導入法によりマウス野生型 KIT の Asp⁸¹⁴ を他の 19 種類のアミノ酸に置換した変異型 KIT と Asp⁸¹⁴ を欠失させた変異型 KIT を作製し、Asp⁸¹⁴ を置換したほとんどすべての変異型 KIT が構成的に活性化していることを明らかにした。一方、Asp⁸¹⁴ を欠失させた変異型 KIT は loss-of-function の状態となっていた。また、表面発現の低下機構を明らかにするため野生型 KIT と Asp⁸¹⁴ を、他のアミノ酸に置換した変異型 KIT の degradation を検討したところ、変異型 KIT は野生型 KIT に比べて構成的な degradation が起こっており、そのために表面発現が低下していることを示した。

以上の結果より KIT の Asp⁸¹⁴ は KIT 活性化制御に必須のアミノ酸残基であり、その変異は KIT の活性化と発現に関与していることが明らかとなった。最近、ヒトの造血器腫瘍の一部においてこの変異と同じ c-kit 遺伝子の突然変異が報告され、これらの疾患と c-kit 活性化突然変異との関連が強く示唆されている。本研究は KIT の活性化制御における Asp⁸¹⁴ の重要性を示し、c-kit 遺伝子の構造異常による細胞の腫瘍化機構の一端を明らかにしたもので、造血器腫瘍に関する重要な知見であると考えられる。よって本研究は学位に値すると判断する。